Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Röntgendiagnostik
der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. F. Heß

Untersuchungen zur Möglichkeit der enzymatischen Tumordiagnostik am Beispiel der Lactatdehydrogenase beim Walker - Carcinom

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
des Fachbereiches Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Rolf Thiele

aus Bochum

Marburg 1971

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Röntgendiagnostik
der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. F. Heß

Untersuchungen zur Möglichkeit der enzymatischen Tumordiagnostik am Beispiel der Lactatdehydrogenase beim Walker - Carcinom

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
des Fachbereiches Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Rolf Thiele

aus Bochum

Marburg 1971

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am 7. Dezember 1971

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. W. Dölle, Prodekan
Referent: Prof. Dr. med. F. Heß
Correferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H.-J. Hering

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

II. Fragestellung

III. Allgemeine Betrachtungen über die Lactatdehydrogenase

IV. Untersuchungsmethodik

V. Ergebnisse

VI. Statistische Sicherung

VII. Auswertung und Diskussion

VIII. Zusammenfassung

IX. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

Seitdem durch verschiedene Untersuchungen als erwiesen gelten kann, daß es bei der Tumorentstehung zu Stoffwechselstörungen im zellulären Bereich kommt (3, 5, 6, 7, 8, 9), ist man intensiv bemüht, mit Hilfe der Enzymdiagnostik die Fermentaktivitäten zu messen, um über Ursprung und Verhalten des Krankheitsgeschehens Aufschluß zu erhalten.

Grundlage der Enzymdiagnostik ist die Tatsache, daß es unter der Einwirkung eines schädlichen Agens zu einer Steigerung der Membranpermeabilität der Zellen kommt und als Folge ein gesteigerter Austritt der Enzyme aus den Zellen ins Blutplasma stattfindet, wo sich die Fermentaktivitäten dann meßbar erhöhen (15, 21). Dabei ist es das Ziel, eine krankheits- und organspezifische Aussage zu machen, was nur selten realisierbar ist. Um brauchbare Resultate zu erzielen, mißt man die Aktivität mehrerer kritischer Enzyme im Serum, wobei dann die Relation der einzelnen Aktivitäten als Enzymmuster oft bestimmte Aussagen über Krankheit und Organ zuläßt.

Die Enzyme selbst verhalten sich unabhängig von Ursprungsort und -art stets kinetisch gleichartig. Entscheidende Veränderungen bestehen jedoch hinsichtlich der Quantität. Dabei ist allerdings das Enzymmuster des Organs mit dem Serum-Enzymmuster nicht immer identisch. Diese Verzerrung ist im wesentlichen dadurch bedingt, daß die Enzyme aus den geschädigten Zellen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit austreten und im Serum verschieden schnell inaktiviert werden.

Für die Tumordiagnostik hatten sich aus den über einem Jahrzehnt laufenden Untersuchungen (Bodanski, Merten, Schwarz)

einige Enzyme als besonders reagibel herauskristallisiert. Besondere Bedeutung hat dabei die Lactatdehydrogenase erlangt, da sie im Tumorgewebe im Vergleich zum Muttergewebe erhöht ist (33, 46, 58, 59, 75, 76, 77). Dieser Anstieg ist bedingt durch eine Zunahme der anaeroben Glykolyse im Tumorgewebe. Da es nach Röntgenbestrahlung durch eine Synthesestörung der NAD und eine Hemmung der Glykolyse zu einer Abnahme der LDH-Gesamtaktivität kommt (1, 14, 38), bietet sie sich zu strahlenklinischen enzymologischen Untersuchungen bevorzugt an.

II. Fragestellung

Von der Tatsache ausgehend, daß maligne Zellen strahlensensibler als Normalzellen sind und die Schädigung durch die ionisierende Strahlung zum Verlust zelleigener Enzyme führt, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, in Abhängigkeit vom Tumorwachstum festzustellen,

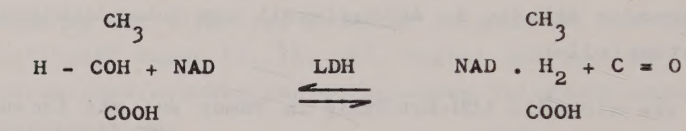
1. wie sich die LDH-Erhöhung im Tumor auf die Isoenzyme verteilt,

2. ob eine Korrelation der Gesamtaktivität und Isoenzymmuster zwischen Tumor und Serum besteht und

3. wie sich diese Größen unter der Bestrahlung ändern.

III. Allgemeine Betrachtungen über die Lactatdehydrogenase

Die Lactatdehydrogenase ist ein Ferment der Glykolyse, das die Reaktion



Brenztraubensäure — Milchsäure

katalysiert und in den verschiedenen Geweben des Organismus in verschiedenen Konzentrationen vorhanden ist (2, 4, 10, 42, 44, 47, 60).

1940 gelang des SRAUB zum ersten Male, die LDH zu kristallisieren. Ihm folgten KUBOWITZ und OTT, die die LDH aus Rattenmuskel und dem Jensen-Sarkom isolierten.

Es ließ sich nachweisen, daß die Enzymproteine der LDH der verschiedenen Organe unterschiedlich sind hinsichtlich ihrer Fraktionen (12, 19) und es gelang mit Hilfe verschiedenster Verfahren, die einzelnen Isoenzyme voneinander zu trennen und aufzuzeigen (64, 65, 75, 74).

Die LDH setzt sich bei Tieren aus fünf elektrophoretischen Formen zusammen, die zwei gesonderte Enzymtypen (M + H) mit drei dazwischen liegenden Hybriden beinhalten. Es darf als sicher gelten, daß die Hybride durch Zufall entstehen und ihre Konzentration nach binomischer Verteilung erfolgt.

Die M- und die H-Form der LDH werden durch zwei verschiedene Gene kontrolliert und sind verschiedenartig

in ihrer Aminosäurensequenz, in den katalytischen Eigenschaften und den immunologischen Reaktionen (42, 43, 44, 51, 55, 57, 61). Man nimmt an, daß beide Typen (M + H) als Tetramers vorkommen und sich aus gleichen Polypeptideinheiten zusammensetzen. Sie werden als M_4 und H_4 bezeichnet (34, 35, 36, 70).

M_4 wandert als Isoenzym 1 am weitesten zur Anode,

H_4 wandert als Isoenzym 5 am weitesten zur Katode.

In Ergänzung zu diesen beiden homologen Formen wurden Hybride identifiziert, die als $M_3 H_1$, $M_2 H_2$ und $M_1 H_3$ bezeichnet werden und die in ihren immunologischen, katalytischen und physikalischen Eigenschaften zwischen den reinen Formen liegen. Es hat sich gezeigt, daß in Geweben, in denen Glykolyse vorherrscht, wie in der Skelettmuskulatur, dem Enzym vom M-Typ eine große Bedeutung zukommt, während der H-Typ in Geweben mit relativ konstanten Metaboliten vorkommt. Maximal können bei der Stärkegelelektrophorese fünf Isoenzyme getrennt werden (11, 22, 60, 73, 75).

IV. Untersuchungsmethodik

Zur Verwendung gelangten Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von ca. 250 Gramm, die in einem Raum mit konstanter Temperatur von 25°C in Kästen zu je fünf Ratten untergebracht waren. Als Futter wurde Altromin-Mischfutter verwendet und Wasser in unbegrenzter Menge angeboten.

Die Untersuchungen erstreckten sich auf das Walker-Carcinom, das freundlicherweise von Herrn Gericke der Firma Hoechst, Frankfurt, zur Verfügung gestellt wurde.

Die uns übersandten Tiere wurden erst nach 12 Tagen, als der Tumor sich als eine etwa Hühnerei große Geschwulst erwies, durch Nackenschlag getötet, wobei darauf geachtet werden mußte, daß die Geschwulst nicht getroffen wurde, um Haemorrhagien zu vermeiden.

Unter sterilen Kautelen wurde der Tumor freipräpariert, entfernt, von Bindegewebe und Nekrosen losgelöst sowie mit Hilfe einer Embryonen-Quetsche mechanisch zerkleinert. Der anfallende Brei wurde im Mörser zerrieben und unter Zufügung von Hanks-Lösung auf 1 : 5 verdünnt. Hiervon wurden pro Ratte 0,5 ml intramuskulär in die Nackengegend mit einer Injektionsnadel der Größe 1405 - 15 überimpft, wobei die Einstichstelle jeweils vorher mit Alkohol gesäubert wurde. Um eine hohe Angehrate zu gewährleisten, wurden die zur Injektion vorbereiteten Tiere nicht narkotisiert und damit eine Mangeldurchblutung des Gewebes ausgeschlossen.

Damit statistisch gültige Aussagen gewährleistet werden konnten, umfaßte jede im Folgenden zu untersuchende Reihe 10 Tiere. Es wurden jeweils 10 Tiere am 3., 6., 9., 12., 15., 18. und 21. Tage untersucht.

Am dritten Tage nach der Implantation wurde je 10 ml Blut durch Punktion gewonnen, bei 1.000 Umdrehungen zentrifugiert und das Serum photometrisch enzymatisch auf die Gesamtaktivität der LDH untersucht, und zwar mit Hilfe des LDH-UV-Testes der Firma Boehringer, Mannheim. Bei diesen Untersuchungen wurde auf möglichst rasche Abwicklung Wert gelegt, um Aktivitätseinbußen zu vermeiden. Haemolysierte Seren wurden verworfen.

Zur Isoenzymbestimmung wurden die Isoenzym-Elektrophorese-Geräte der Firma Boskamp benutzt.

Als Agar-Gel wurde Difco-Spezial Agar Noble verwendet. 1 Gramm Agar wurde mit 50 ml Aqua-bidest und 50 ml Pufferlösung (8,92 g Veronal-Na, 5,88 g Na-Acetat reinst., 120 ml 0,1 n HCL auf 1.000 ml) bei einem p_H von 8,6 gemischt und erhitzt. Der erhitzte Agar wurde in einer Menge von 2 ml auf Objektträger von 76 x 26 mm aufgebracht und bildete nach Erstarren eine 0,5 mm hohe Schicht, in die nach Ausstanzen eines Schlitzes von 5 mm Länge und 1 mm Breite Blutserum gefüllt wurde. Dabei war darauf zu achten, daß nicht mehr Serum, als zur Ausfüllung des Stanzloches erforderlich, eingebracht wurde.

Der zur Elektrophorese nötige Puffer bestand in seiner Zusammensetzung aus:

Veronal-Na 25,75 g
Veronal 4,60 g auf 1.000 ml aqua dest.
p_H 8,0

Die Elektrophorese-Kammer umfaßte acht Objektträger, wobei der Strom auf 32 mA eingestellt wurde und die Trenndauer auf 120 min befristet war. Die während dieser Zeit erforderliche Kühlung wurde durch einen von Wasser durchflossenen Kühlblock gewährleistet.

Nach der Trennung wurden die Objektträger in einer Schale nach der Methode van der Helm gefärbt, die Färbung erfolgte in einem Ultra-Thermostat Type WB 20 Elektronic von Lauda bei 37°C und 60 min Dauer. Die hierzu erforderlichen Farblösungen setzten sich zusammen aus

I.	Lithiumlactat	0,710 g	
	Natriumcyanid	0,050 g	
	$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	1,869 g	
	KH_2PO_4	0,272,2 g	in 90 ml aqua-bidest.
	Nitroblau Tetrazolium	0,025 g	
II.	Phenazin Methosulfat	3 mg	
	NAD	112 mg	

Die Färbung erfolgte durch die enzymatische Fähigkeit der LDH, das Überangebot der Färbelösung an Lactat in Pyruvat zu oxydieren. Hierbei wird der Wasserstoff - über eine Reihe von Zwischenträgern - auf ein oxydiertes Tetrazolium übertragen. Seine Reduktion führt zum Ausfall eines wasserlöslichen, blaugefärbten Salzes.

Anschließend wurden die gefärbten Objektträger 1/4 Stunde lang in Fixierlösung

Äthanol, Essigsäure + aqua-bidest.
im Verhältnis 75 : 5 : 25

gelegt, um danach in nassem Filterpapier zu trocknen.

Zur anschließenden Auswertung der Isoenzymbanden wurde ein Extinktions- und Integralschreiber der Firma Carl Zeiss mit einem Lichtfilter FE 60 benutzt und die Extinktionskurve sowie der Flächeninhalt jedes einzelnen Objektträgers bestimmt. Die gefundene Extinktionskurve gibt die Verteilung der Eiweißfraktionen an.

Unter Voraussetzung der Proportionalität zwischen Eiweiß- und Farbstoffmenge sowie zwischen dieser und der Extinktion bildet die von der Extinktionskurve und ihrer Basislinie eingeschlossene Fläche ein Maß für die untersuchte Eiweißmenge. Den gesuchten Mengen der einzelnen Proteinfraktionen entsprechen dann die Teilflächen zwischen den zugeordneten Kurvenstücken und deren Basislinie. Die den Eiweißfraktionen entsprechenden Teilflächen wurden sofort Vergleich der Integralkurve mit der korrespondierenden Extinktionskurve oder - sofern dies durch besonders intensiv angefärbte Fraktionen nicht möglich war-, mit dem Kompensationsplanimeter der Firma A. Ott ermittelt. Bei der zuerst genannten Methode werden mit Hilfe der Auswertungslineale sämtliche Schnittpunkte der Extinktionskurve mit deren Basislinie auf die Integralkurve übertragen, Hilfslinien eingezeichnet und mit Hilfe des Auswertungsrahmens die für die relativen Mengen der Eiweißfraktionen zutreffenden Werte abgelesen und tabellarisch zusammengefaßt.

Am 6. Tage nach Implantation war bei den Ratten makroskopisch eine Erhebung der Rückenpartie zu erkennen. Nach Punktion des Blutes wurde den Tieren dieser Reihe unter Benutzung steriler Instrumente der Tumor entfernt, gewogen und in numerierte Schälchen gebracht. 1 Gramm des zu untersuchenden Tumormaterials wurde unter Beigabe von 10 ml NaCl im Ultraturrax TP 18/2 für die Dauer von 5 sec zerkleinert. Da bei der Umfangsgeschwindigkeit des Ultraturrax von 13 m/sec eine Erwärmung mit anschließender Veränderung des Gewebes die Folge gewesen wäre, wurde das Reagenzglas während des Aufbereitungsprozesses in einem Eisbehälter fixiert. Anschließend wurde in einem Zellhomogenisator der Firma Colora bei einer konstanten Temperatur von $4^{\circ}C$ und von 200 U/min die Suspension fünf

Minuten lang aufbereitet. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 15.000 Umdrehungen und $4^{o}C$ wurde das gewonnene Serum mit der oben angegebenen Methode elektrophoretisch aufgetrennt.

Bei der Bestimmung der Gesamt-LDH-Aktivität war es erforderlich, das zu untersuchende Tumorserum auf 1 : 100 in physiolog. NaCl zu verdünnen, da andernfalls eine zu hohe LDH-Konzentration vorgelegen hätte (Extinktionsabnahme größer als 0,020 min). Von dieser Verdünnung gelangten 0,1 ml zur photometrischen Bestimmung. Das Ergebnis wurde mit 100 multipliziert.

Diese Untersuchungen wurden bis zum 21. Tage im Abstand von 3 Tagen durchgeführt, so daß sieben Reihen à 10 Tiere = 70 Tiere in die Wertung gelangten.

Um eine Aussage über Anstieg und Verhalten der LDH machen zu können, wurden Seren von 10 Normaltieren untersucht und die gefundenen Gesamtaktivitäten und Enzymbanden mit den Werten der tumortragenden Tiere in Vergleich gesetzt.
Alle Ergebnisse wurden tabellarisch zusammengefaßt.

Um eine vermutete Veränderung der LDH-Gesamtaktivität und der Enzymbanden nach Röntgenbestrahlung feststellen zu können, wurden unter gleichen Transplantationsbedingungen wie oben beschrieben drei Reihen von je 10 Tieren mit Walker-Carcinom beimpft und am 6. Tage nach makroskopischem Sichtbarwerden einer Geschwulst unter Tiefentherapiebedingungen (200 KV, 0,5 mm Cu-Filterung, Halbwertsschicht 0,10 mm Cu) mit 500 R bestrahlt. Durch den zur Anwendung gelangten Rundtubus von 4 cm Durchmesser lag nur der Tumor im Strahlengang, wobei die Ratten allerdings narkotisiert waren, um eine stabile Seitenlage zu gewährleisten. Hierdurch war eine strahlenbedingte

Schädigung des Rückenmarkes ausgeschlossen.

Am 1., 3. und 5. Tage nach Bestrahlung wurde jeweils eine Reihe untersucht. Diese Ergebnisse sind tabellarisch zusammengefaßt worden.

V. Ergebnisse

Normalblut						
Tier	Serum	Isoenzyme Serum				
		1	2	3	4	5
1	157	13	-	3	-	60
	162	10	-	-	2	74
	143	12	-	-	-	70
	206	13	1	3	-	70
	212	10	-	1	-	60
	234	12	-	-	2	65
	228	15	-	-	-	62
	248	14	-	3	-	64
	215	13	-	-	-	65
10	218	11	-	-	-	61

Tab. 1: Laktatdehydrogenase und Verteilung ihrer Isoenzyme im Blut

W a l k e r - C a r c i n o m 3. Tag

Tier	Tumor-gewicht 1)	LDH Tumor 2)	Isoenzyme Tumor 3) 1	2	3	4	5	LDH Serum 4)	Isoenzyme Serum 3) 1	2	3	4	5
1								234					
								228					
								259					
								234					
								206					
								270					
								255					
								243					
								277					
								293					
10													

1) in g
2) in mu/g
3) in rel. %
4) mu/ml

Tab. 2: Laktatdehydrogenase sowie Verteilung ihrer Isoenzyme im Serum am 3. Tag nach der Tumortransplantation beim Walker-Carcinom

Walker-Carcinom 6. Tag													
Tier	Tumor-gewicht [1]	LDH Tumor [2]	Isoenzyme Tumor [3]					LDH Serum [4]	Isoenzyme Serum [3]				
			1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
1	2	38.700	3	1	3	18	74	317	5	-	9	4	78
	1,5	20.900	12	4	6	19	59	240	17	-	14	3	61
	2,5	43.700	9	2	4	21	64	357	8	-	2	4	84
	2	41.200	15	1	8	20	56	221	7	-	6	3	80
	2	19.600	11	1	3	14	71	235	11	-	8	3	74
	1,5	29.400	4	2	4	7	83	308	6	-	6	6	63
	2	35.900	20	3	2	11	54	292	9	-	7	4	79
	3	41.500	12	1	3	9	55	307	5	-	11	3	81
	2	40.100	9	1	6	8	76	316	7	-	8	3	82
10	1,5	34.200	8	1	7	11	68	318	11	-	6	4	79

1) in g
2) in mu/g
3) in rel. %
4) mu/ml

Tab. 3: Tumorgewicht und Laktatdehydrogenase sowie Verteilung ihrer Isoenzyme im Tumor und Serum beim Walker-Carcinom am 6. Tag nach der Transplantation

W a l k e r - C a r c i n o m 9. Tag

Tier	Tumor-gewicht [1]	LDH Tumor [2]	Isoenzyme Tumor [3]					LDH Serum [4]	Isoenzyme Serum [3]				
			1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
1	3	45.300	3	3	1	18	57	382	9	-	3	-	80
	3	35.100	4	1	-	4	86	660	13	-	9	-	71
	3	53.700	7	1	5	6	81	535	11	-	9	-	75
	2	39.600	4	2	6	9	79	325	13	1	8	3	70
	3	48.700	5	4	4	13	64	472	10	-	6	-	70
	2	29.900	17	3	4	18	58	422	10	-	5	3	76
	2	50.100	17	1	3	10	69	487	-	-	5	6	84
	1,5	57.200	12	1	5	19	53	518	11	1	6	3	78
	3	55.400	15	2	4	8	71	493	9	-	3	2	81
10	2,5	43.600	8	1	4	11	76	377	8	3	5	-	79

1) in g
2) in mu/g
3) in rel. %
4) mu/ml

Tab. 4: Tumorgewicht und Laktatdehydrogenase sowie Verteilung ihrer Isoenzyme im Tumor und Serum beim Walker-Carcinom am 9. Tag nach der Transplantation

Walker-Carcinom 12. Tag														
Tier	Tumor-gewicht [1]	LDH Tumor [2]	Isoenzyme Tumor [3]					LDH Serum [4]	Isoenzyme Serum [3]				
			1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
1	4	77.200	6	4	6	22	58	669	5	-	2	2	39
	4	80.900	4	6	8	24	58	650	24	-	10	4	57
	5	88.900	6	3	2	22	54	907	9	4	9	2	47
	3	64.000	4	4	5	25	49	525	14	-	11	4	49
	4	82.300	2	3	2	22	57	630	5	-	4	3	49
	2,5	70.700	3	5	3	28	61	573	12	-	4	-	71
	4	80.500	11	-	2	7	80	573	10	3	7	-	47
	4,5	59.400	2	3	10	22	63	628	6	-	8	-	73
	3	77.600	5	4	5	24	57	617	11	-	3	2	63
10	3,5	63.200	4	2	6	19	61	601	10	3	6	3	59

1) in g
2) in mu/g
3) in rel. %
4) mu/ml

Tab. 5: Tumorgewicht und Laktatdehydrogenase sowie Verteilung ihrer Isoenzyme im Tumor und Serum beim Walker-Carcinom am 12. Tag nach der Transplantation

W a l k e r - C a r c i n o m 15. Tag

Tier	Tumor-gewicht 1)	LDH Tumor 2)	Isoenzyme Tumor 3)					LDH Serum 4)	Isoenzyme Serum 3)				
			1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
1	6	153.200	19	2	5	20	54	965	19	-	8	2	66
	5	105.300	12	1	3	11	63	793	16	3	11	2	59
	6	154.900	14	1	4	24	57	716	10	1	9	4	67
	5	123.400	11	2	4	12	61	644	9	-	7	-	73
	6	140.600	19	3	3	26	49	717	7	-	12	3	58
	7	126.000	15	3	3	16	53	793	12	2	4	2	70
	4	112.700	16	4	5	12	63	686	6	-	8	3	61
	4	150.100	13	1	6	19	61	805	18	2	13	4	56
	3,5	115.400	18	1	3	20	58	812	17	-	4	2	73
10	6	99.800	17	1	4	21	57	591	7	-	6	2	71

1) in g
2) in mu/g
3) in rel. %
4) mu/ml

Tab. 6: Tumorgewicht und Laktatdehydrogenase sowie Verteilung ihrer Isoenzyme im Tumor und Serum beim Walker-Carcinom am 15. Tag nach der Transplantation

Walker-Carcinom 18. Tag													
Tier	Tumor-gewicht [1]	LDH Tumor [2]	Isoenzyme Tumor [3]					LDH Serum [4]	Isoenzyme Serum [3]				
			1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
1	7	148.200	8	5	11	19	57	676	11	-	4	2	82
	7	180.100	7	3	9	18	63	852	9	-	2	2	87
	6	137.600	2	4	13	20	61	823	13	-	7	3	77
	8	156.100	8	6	6	4	76	796	8	-	5	-	81
	5	120.300	17	2	8	24	49	917	10	-	8	3	79
	7	144.400	8	5	7	22	58	601	17	-	5	2	76
	6	153.200	17	3	5	14	61	875	8	-	7	1	84
	8	115.300	9	3	12	19	57	912	10	-	4	-	86
	7	131.900	13	1	8	24	54	807	17	-	2	-	81
10	6	113.700	16	2	5	12	65	793	6	-	9	3	32

1) in g

2) in mu/g

3) in rel. %

4) mu/ml

Tab. 7: Tumorgewicht und Laktatdehydrogenase sowie Verteilung ihrer Isoenzyme im Tumor und Serum beim Walker-Carcinom am 18. Tag nach der Transplantation

W a l k e r - C a r c i n o m 21. Tag

Tier	Tumor-gewicht [1]	LDH Tumor [2]	Isoenzyme Tumor [3]					LDH Serum [4]	Isoenzyme Serum [3]				
			1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
1	9	127.700	18	2	5	21	44	873	10	1	9	3	44
	8	183.200	20	1	3	20	56	986	16	1	8	2	73
	6	163.400	11	1	4	21	63	692	5	-	4	2	89
	8	155.600	10	3	6	23	58	812	5	2	6	3	84
	5	143.200	13	2	3	14	58	771	8	-	5	3	84
	7	180.900	14	2	4	19	61	982	16	-	3	2	79
	8	155.300	7	-	2	22	69	893	19	-	7	1	73
	9	129.600	13	-	2	19	66	877	7	2	4	1	86
	5	163.100	14	1	4	18	63	763	5	-	4	2	87
10	6	173.900	12	2	4	23	59	954	7	1	4	1	87

1) in g
2) in mu/g
3) in rel. %
4) mu/ml

Tab. 8: Tumorgewicht und Laktatdehydrogenase sowie Verteilung ihrer Isoenzyme im Tumor und Serum beim Walker-Carcinom am 21. Tag nach der Transplantation

W a l k e r - C a r c i n o m

bestrahlt am 9. Tag nach Transplantation, 1. Tag nach Bestrahlung

Tier	Tumor-gewicht [1]	LDH Tumor [2]	Isoenzyme Tumor [3]					LDH Serum [4]	Isoenzyme Serum [3]				
			1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
1	3	45.000	5	5	7	43	30	420	6	10	3	4	77
	2	57.700	7	14	10	39	30	601	17	8	2	1	62
	4	53.000	6	7	7	20	43	553	16	13	1	2	64
	3	52.500	15	9	3	22	28	449	12	14	1	2	51
	3	49.400	7	14	10	39	30	586	9	6	2	4	58
	2	55.200	5	6	7	40	32	543	16	8	1	7	48
	4	48.700	7	7	3	28	35	473	15	10	1	5	59
	4	54.300	6	5	5	37	41	355	20	6	2	7	50
	3	41.900	10	11	10	31	29	482	8	5	2	6	42
10	2	52.600	8	10	7	29	47	280	13	9	2	4	44

1) in g

2) in mu/g

3) in rel. %

4) mu/ml

Tab. 9: Tumorgewicht und Laktatdehydrogenase sowie Verteilung ihrer Isoenzyme im Tumor und Serum beim Walker-Carcinom, am 9. Tag nach der Transplantation unter Tiefentherapiebedingungen mit 500 R bestrahlt, einen Tag nach der Bestrahlung

W a l k e r - C a r c i n o m

bestrahlt am 9. Tag nach Transplantation, 3. Tag nach Bestrahlung

Tier	Tumor-gewicht [1]	LDH Tumor [2]	Isoenzyme Tumor [3]					LDH Serum [4]	Isoenzyme Serum [3]				
			1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
1	4	19.100	2	1	2	2	78	486	15	11	1	5	68
	3	22.900	2	1	3	4	76	382	12	8	2	7	71
	4	34.800	2	1	3	5	80	653	19	13	-	3	54
	5	25.800	2	1	2	4	74	497	11	17	-	6	58
	6	43.100	2	1	2	3	76	483	20	9	2	5	73
	5	27.900	3	2	2	4	74	395	14	10	1	5	49
	4	30.100	3	2	2	4	71	686	24	9	1	4	51
	3	18.700	2	1	2	3	73	412	16	6	2	4	42
	4	26.300	3	2	3	3	59	402	12	5	2	4	77
10	5	24.600	2	1	2	4	63	397	16	7	2	4	61

1) in g
2) in mu/g
3) in rel. %
4) mu/ml

Tab. 10: Tumorgewicht und Laktatdehydrogenase sowie Verteilung ihrer Isoenzyme im Tumor und Serum beim Walker-Carcinom, am 9. Tag nach der Transplantation unter Tiefentherapiebedingungen mit 500 R bestrahlt, drei Tage nach der Bestrahlung

W a l k e r - C a r c i n o m

bestrahlt am 9. Tag nach Transplantation, 5. Tag nach Bestrahlung

Tier	Tumor-gewicht [1]	LDH Tumor [2]	Isoenzyme Tumor [3]					LDH Serum [4]	Isoenzyme Serum [3]				
			1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
1	5	38.200	15	10	6	4	59	248	14	4	1	3	48
	5	47.800	17	8	7	4	60	229	19	6	1	2	52
	4	57.300	13	7	3	4	73	410	20	6	2	2	70
	4	67.000	16	11	10	5	52	630	13	9	1	3	64
	6	39.800	6	6	11	3	70	315	13	3	2	3	49
	7	56.900	12	9	8	6	55	457	15	5	2	4	54
	5	79.100	10	10	8	4	64	293	28	7	1	3	48
	7	44.900	11	5	6	5	73	618	10	3	1	1	63
	5	65.400	16	6	10	7	56	395	17	4	2	4	61
10	6	40.300	17	8	9	5	59	407	9	6	2	4	73

1) in g

2) in mu/g

3) in rel. %

4) mu/ml

Tab. 11: Tumorgewicht und Laktatdehydrogenase sowie Verteilung ihrer Isoenzyme im Tumor und Serum beim Walker-Carcinom, am 9. Tag nach der Transplantation unter Tiefentherapiebedingungen mit 500 R bestrahlt, fünf Tage nach der Bestrahlung

VI. Statistische Sicherung

Für alle möglichen Abhängigkeiten wurden Signifikanzuntersuchungen angestellt. Dabei wurden zunächst die Mittelwerte aller Aktivitäten in Abhängigkeit von den Tagen bestimmt (Tab. 12). In einigen Fällen stellte sich zwischen den Meßreihen wie Gesamtaktivität in Serum und Homogenat eine lineare Abhängigkeit heraus, so daß es sinnvoll erschien, den Pearson'schen Produktmoment-Korrelationskoeffizienten zu bestimmen, der ein Maß für eine Regression darstellt. Für alle weiteren Fälle wurde ebenfalls diese Größe mit Hilfe eines Computers bestimmt. Sie ist deffiniert durch den Ausdruck

$$R = \left(\sum_{i=1}^{N} (X_i - M_x) \quad (Y_i - M_y) \;/\; S_x \cdot S_y \cdot N \right)$$

wobei X_i die Aktivitäten, Y_i die zugehörigen Tumorgewichte bzw. Tage darstellen. M_x, M_y sind die entsprechenden Mittelwerte, S_x, S_y die Streuung der Meßwerte, welche insgesamt N betragen. Für die linearen Abhängigkeiten errechneten sich die erwarteten großen Werte von R (in der Größenordnung von 1). Um die Signifikanz festzustellen, wurden die Mutungsintervalle der Korrelationskoeffizienten auf dem 95 %-Niveau bestimmt. Das bedeutet, daß in 95 % aller Messungen ein Korrelationskoeffizient zwischen diesen beiden Schranken zu erwarten ist. Dabei wurden alle Abhängigkeiten als nicht signifikant verworfen, die einen Korrelationskoeffizienten von R = 0 einschließen.

Das bedeutet, daß über dem untersuchten Gesamtbereich keine signifikante Abhängigkeit vom Tumorgewicht bzw. -tag im Ganzen gesehen zu erwarten ist.

Für Korrelationskoeffizienten, die den Wert 0 im bestimmten Mutungsintervall nicht überstrichen, wurde eine Abhängigkeit auf Signifikanz von einem Argument zum nächsten bestimmt. Diese Untersuchung geschah mit Hilfe des Student-(t-Testes), der einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte nur dann feststellt, wenn der sogenannte t-Wert einen vom Niveau abhängigen Wert t_o überschreitet. Dieser Wert t ist definiert durch

$$t = \frac{d}{\sigma_d} \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}}$$

d bedeutet die Differenz der untersuchten Mittelwerte. N_1, N_2 sind die Anzahl der dazu gehörenden Meßwerte und σ_d die Standartabweichung, die sich aus den Streuungen der betreffenden Meßwerte wie folgt errechnet:

$$d = \sqrt{\frac{\sigma_1^2 \cdot N_1 + \sigma_2^2 \cdot N_2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

Bei den Abhängigkeiten, deren Korrelationskoeffizient R den Wert 0 im bestimmten Mutungsintervall nicht überstrich, mußte der t-Wert auf dem 95 %-Niveau für jeweils N = 10 Tiere den Wert $t_o = 1{,}83$ überschreiten, um eine signifikante Abnahme oder Zunahme zu sichern. Erst dann wurde diese Veränderung in der entsprechenden Zeichnung berücksichtigt. Auf diese Weise erhielt man zum Teil nicht lineare Regressionen, deren Verlauf jedoch statistisch abgesichert ist.

In den Abbildungen sind die linearen Abhängigkeiten aufgetragen.

Verworfen wurden folgende Abhängigkeiten:

1. Sämtliche Isoenzyme im Serum,

2. sämtliche Isoenzyme im Serum und LDH-Gesamtaktivität in Serum und Homogenat nach Röntgenbestrahlung bis auf Isoenzym 2,

3. Isoenzym 1 und 3 im Homogenat.

Die nicht linearen Abhängigkeiten sind den Abbildungen 1 und 2 zu entnehmen. Bei jeder dieser Abbildungen ist R angegeben, sowie das Mutungsintervall auf dem Signifikanzniveau von 95 %, das durch $R_1 \leqq R \leqq R_2$ charakterisiert ist.

Gesamtaktivität

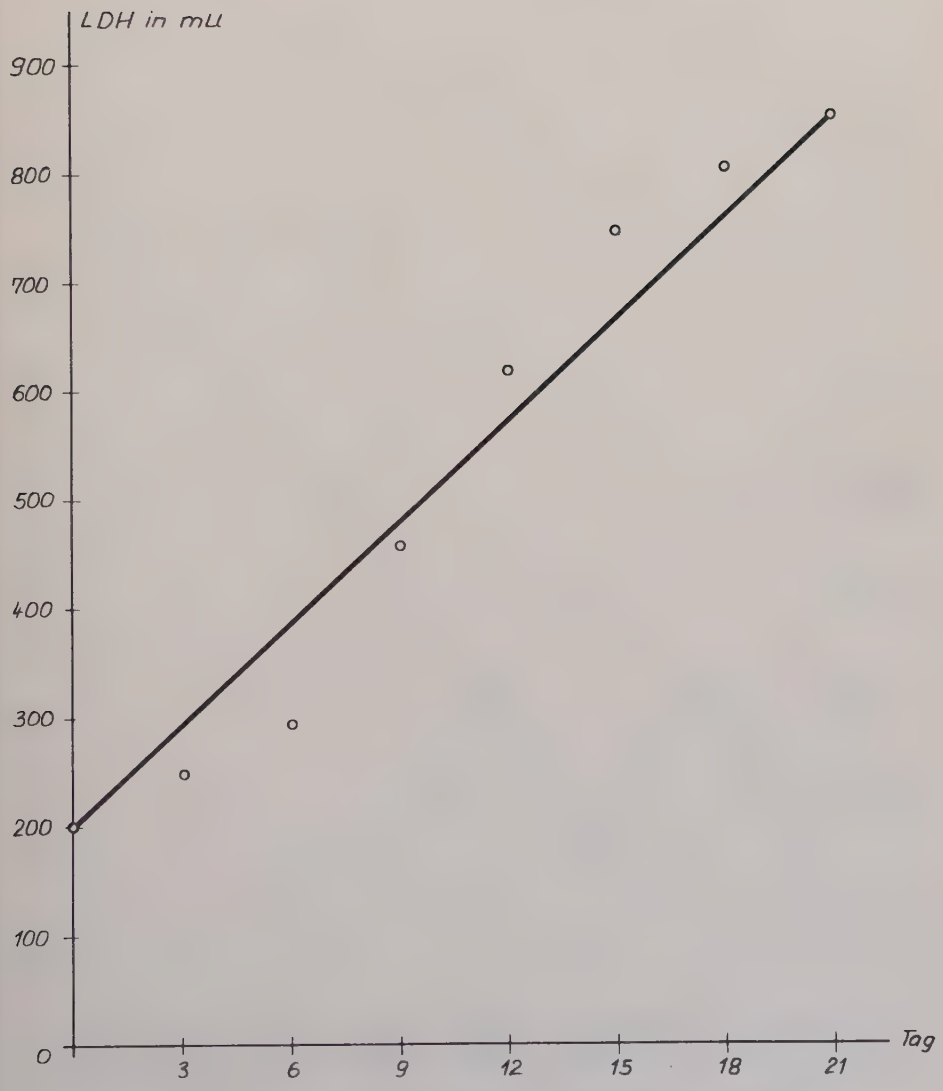
Tag	LDH - Serum M [1]	LDH - Serum S [2]	LDH - Homogenat M	LDH - Homogenat S
0	202,3	35,7		
3	249,9	26,0		
6	291,1	44,2	34.430,0	8.568,7
9	467,1	96,1	45.860,0	8.958,1
12	647,3	103,6	74.470,0	9.674,9
15	752,0	105,3	128.140,0	20.369,3
18	815,2	106,7	140.070,0	20.766,5
21	860,3	99,4	157.590,0	19.500,7
nach Bestrahlung:				
1	474,2	102,8	50.530,0	4.590,8
3	479,3	109,1	27.330,0	7.342,3
5	400,2	139,4	53.670,0	13.773,6

Isoenzyme:

Tag		1 M	1 S	2 M	2 S	3 M	3 S	4 M	4 S	5 M	5 S
0	Ser	12,3	2,0	0,3	0	1,0	1,0	0,4	1,0	64,6	5,0
6	Ser	8,6	4,0	0,0	0	7,7	3,0	3,7	1,0	76,1	8,0
	Hom	10,3	5,0	1,7	1,0	4,6	2,0	13,8	5,0	66,0	10,0
9	Ser	9,4	4,0	0,5	1,0	6,2	2,0	1,7	2,0	76,4	5,0
	Hom	9,2	6,0	1,9	1,0	3,6	2,0	11,6	5,0	69,4	11,0
12	Ser	10,6	6,0	0,7	1,0	6,4	3,0	2,0	2,0	55,4	11,0
	Hom	4,7	3,0	3,4	2,0	4,9	3,0	21,5	6,0	59,8	8,0
15	Ser	12,1	5,0	0,8	1,0	8,2	3,0	2,4	1,0	65,4	6,0
	Hom	15,4	3,0	1,9	1,0	4,0	1,0	18,1	5,0	57,6	5,0
18	Ser	10,9	4,0	0,0	0	5,3	2,0	1,6	1,0	76,5	16,0
	Hom	10,5	5,0	3,4	2,0	8,4	3,0	17,6	6,0	60,1	7,0
21	Ser	10,8	6,0	0,7	1,0	5,4	2,0	2,0	1,0	80,9	8,0
	Hom	13,2	4,0	1,4	1,0	3,7	1,0	20,0	3,0	59,7	7,0
nach Bestrahlung:											
1	Ser	13,2	4,0	8,9	3,0	1,7	1,0	4,2	2,0	55,5	11,0
	Hom	7,6	3,0	8,8	3,0	6,9	3,0	32,8	8,0	34,5	7,0
3	Ser	15,9	4,0	9,5	4,0	1,3	1,0	4,7	1,0	60,4	12,0
	Hom	2,3	0	1,3	0,0	2,3	0,0	3,6	1,0	72,4	7,0
5	Ser	15,8	6,0	5,3	2,0	1,5	1,0	2,9	1,0	58,2	9,0
	Hom	13,3	4,0	8,0	2,0	7,8	2,0	4,7	1,0	62,1	8,0

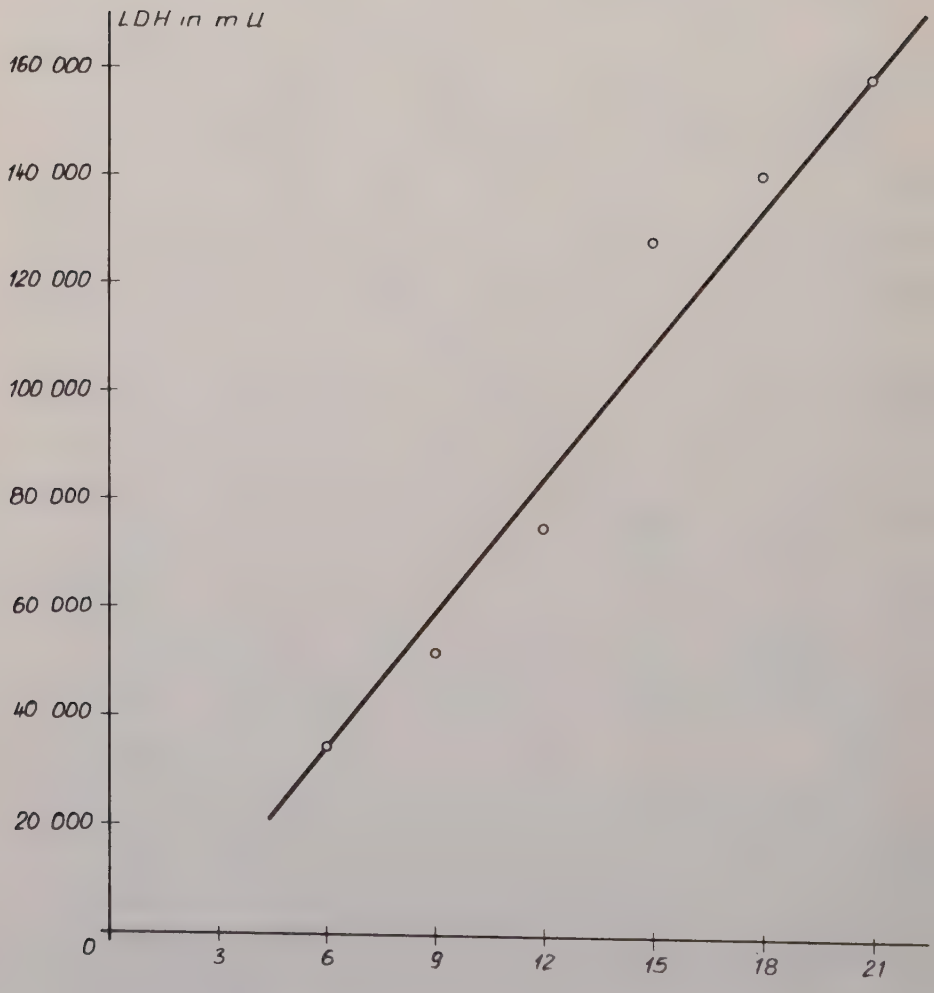
1) M = Mittelwert
2) S = Streuung

Tabelle 12: Mittelwerte und Streuung aller Werte der Tabellen 1 bis 11



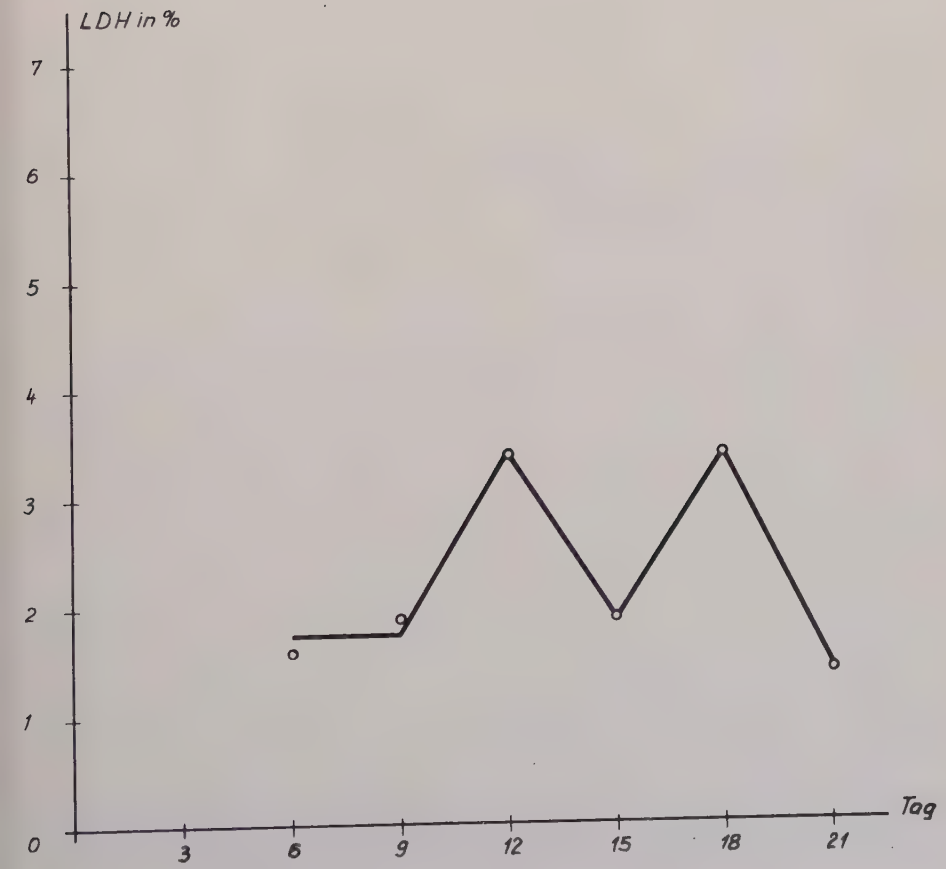
Walker LDH-Gesamtaktivität im Serum

Abb. 1



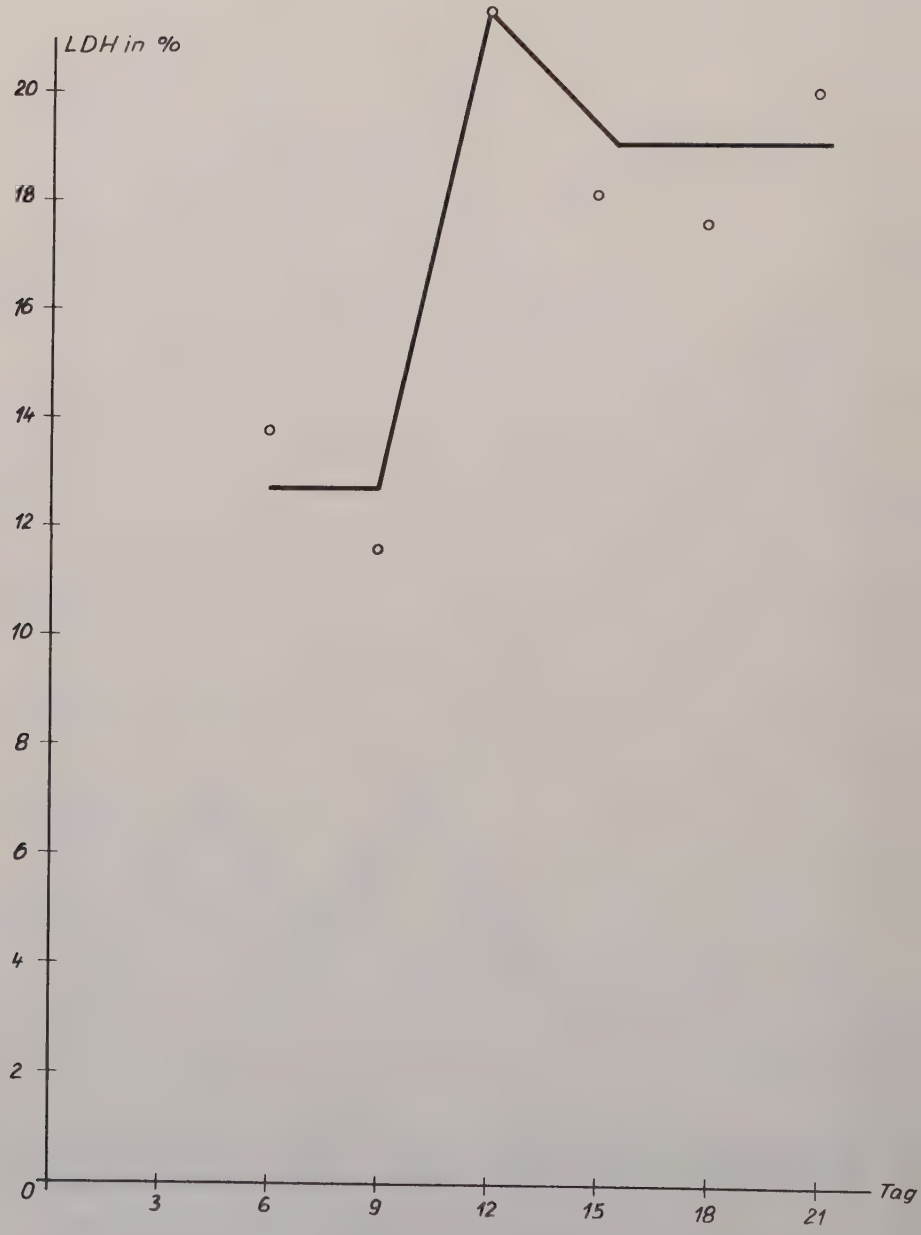
Walker LDH-Gesamtaktivität im Homogenat

Abb. 2



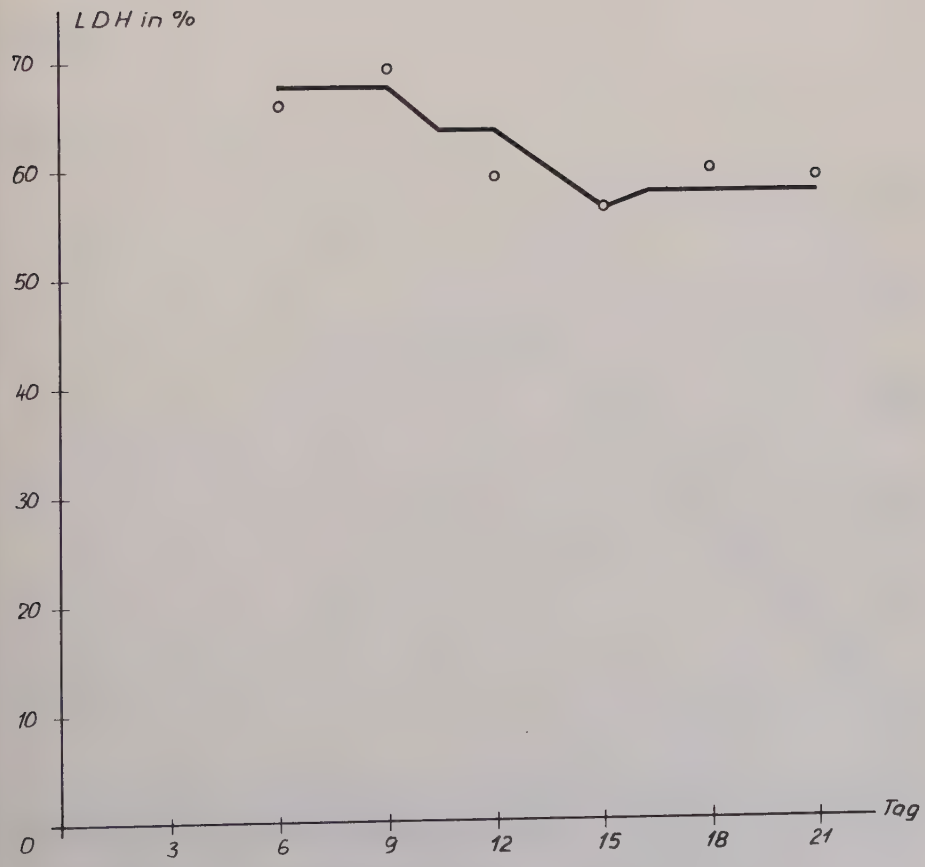
Walker Isoenzym 2 im Homogenat

Abb. 3



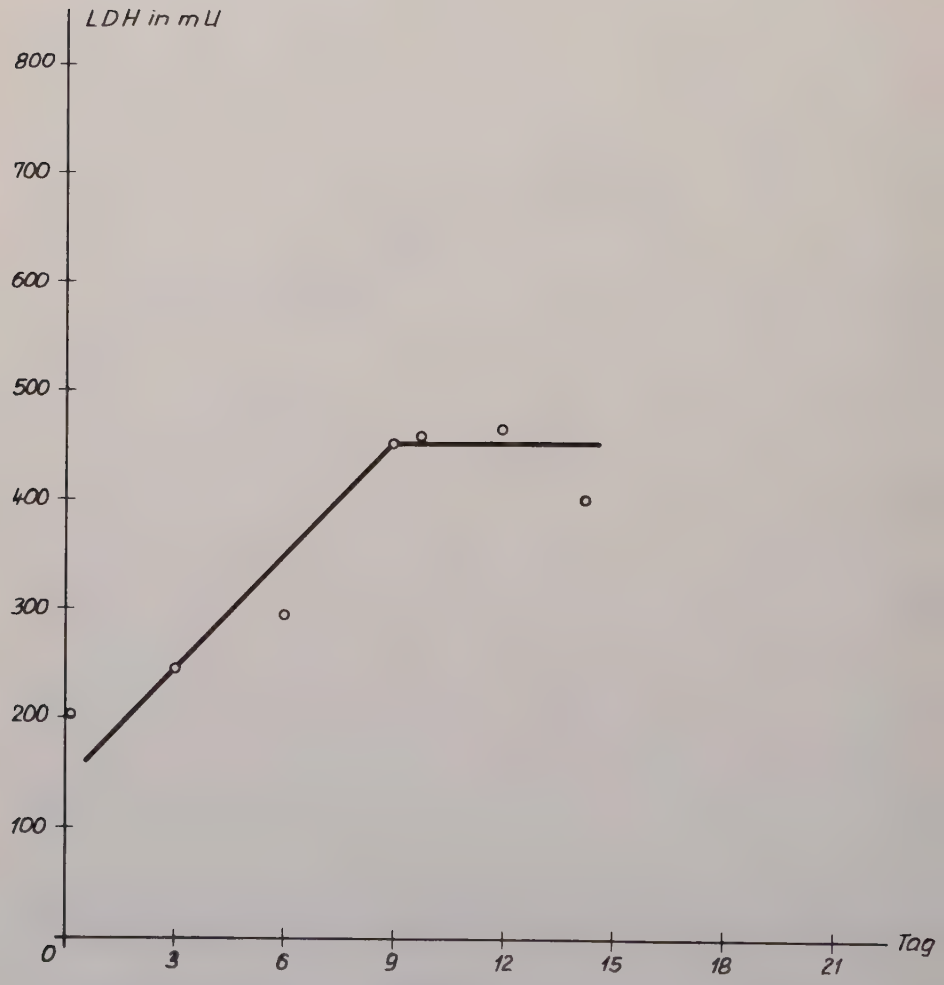
Walker Isoenzym 4 im Homogenat

Abb. 4



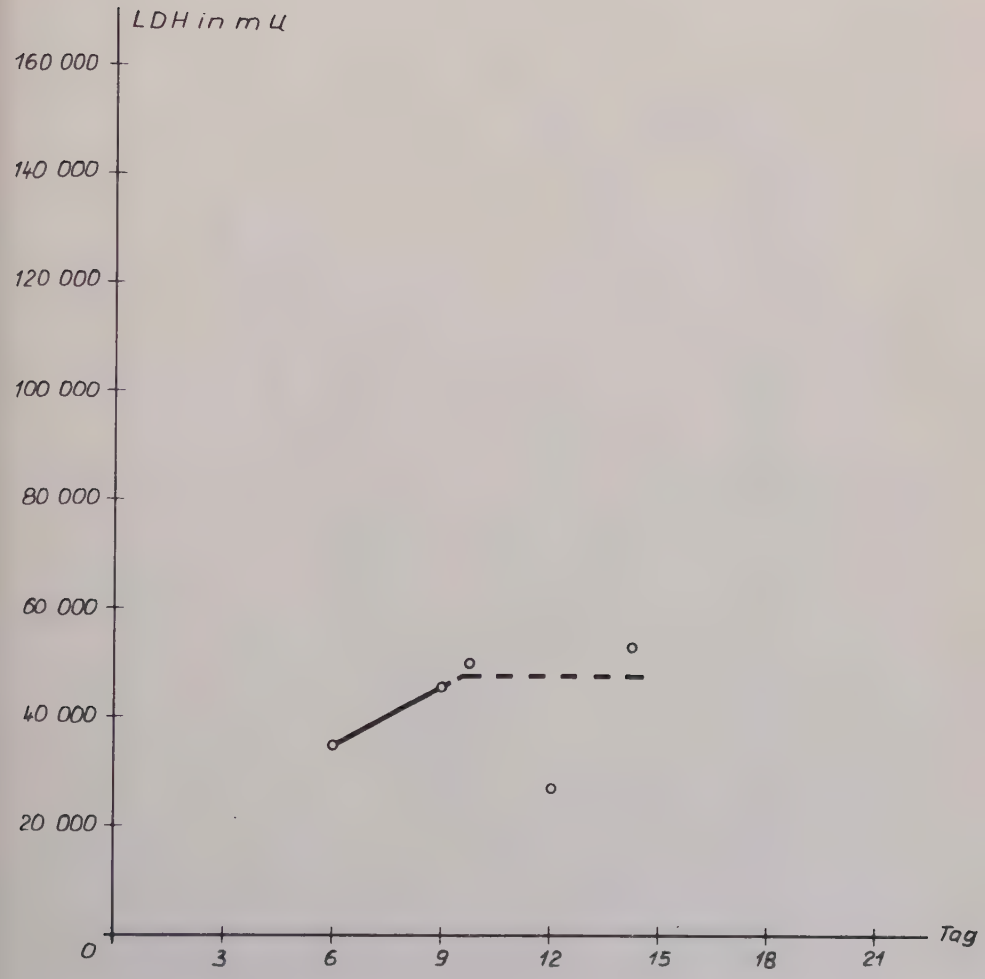
Walker Isoenzym 5 im Homogenat

Abb. 5



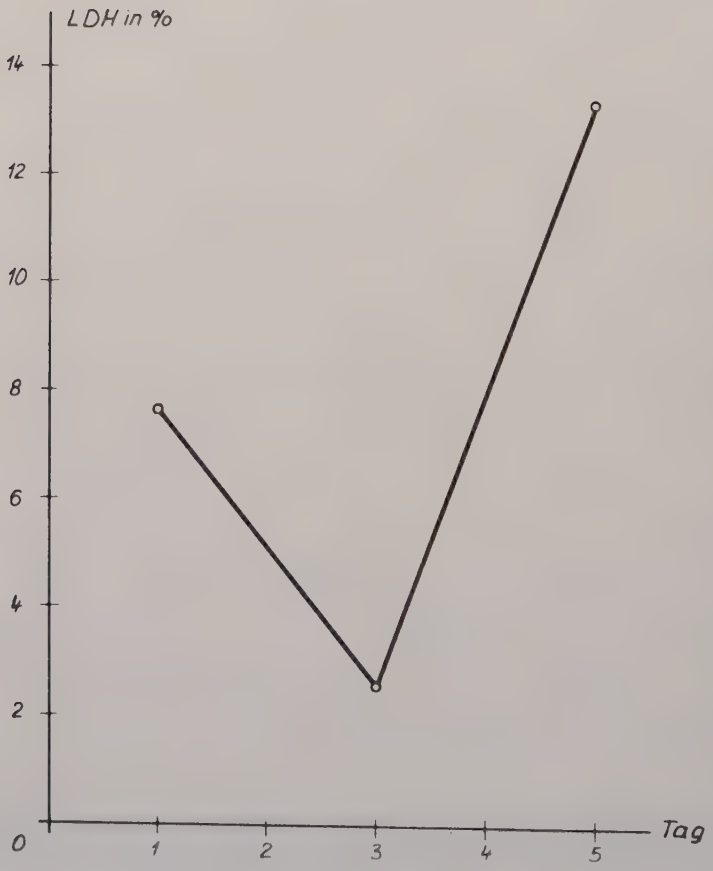
Walker LDH-Gesamtaktivität im Serum nach Röntgenbestrahlung

Abb. 6



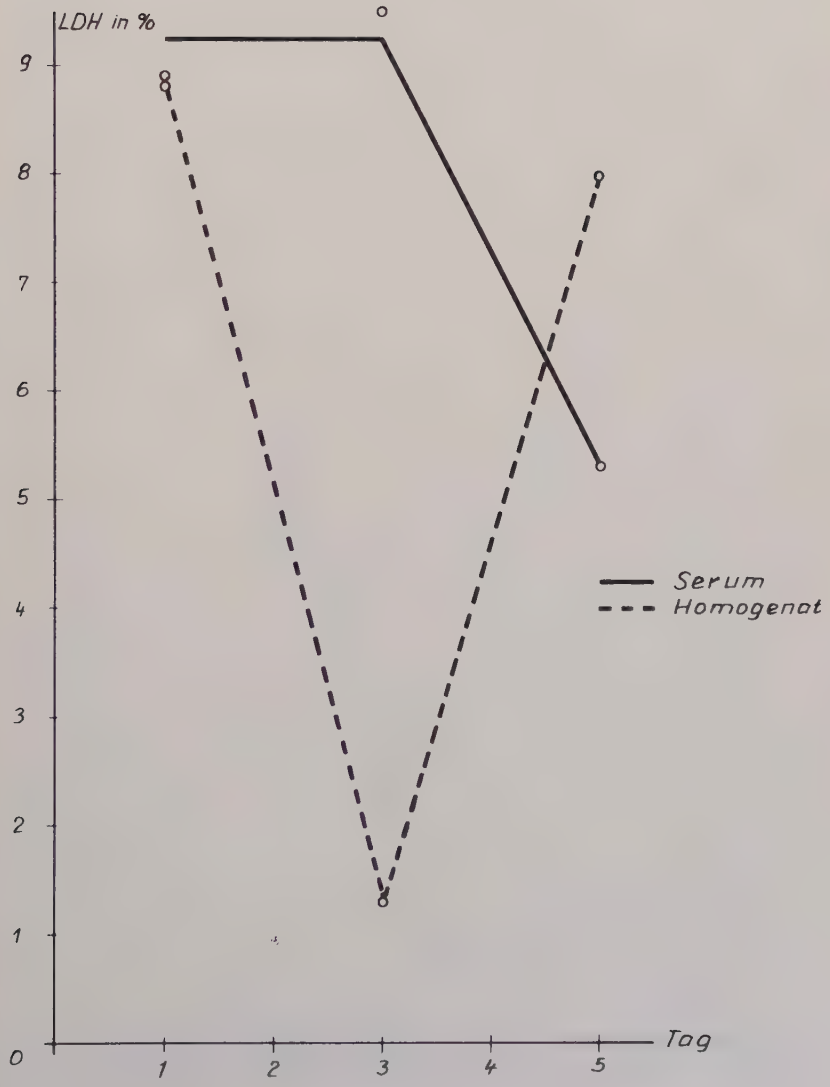
Walker LDH-Gesamtaktivität im Homogenat nach Röntgenbestrahlung

Abb. 7



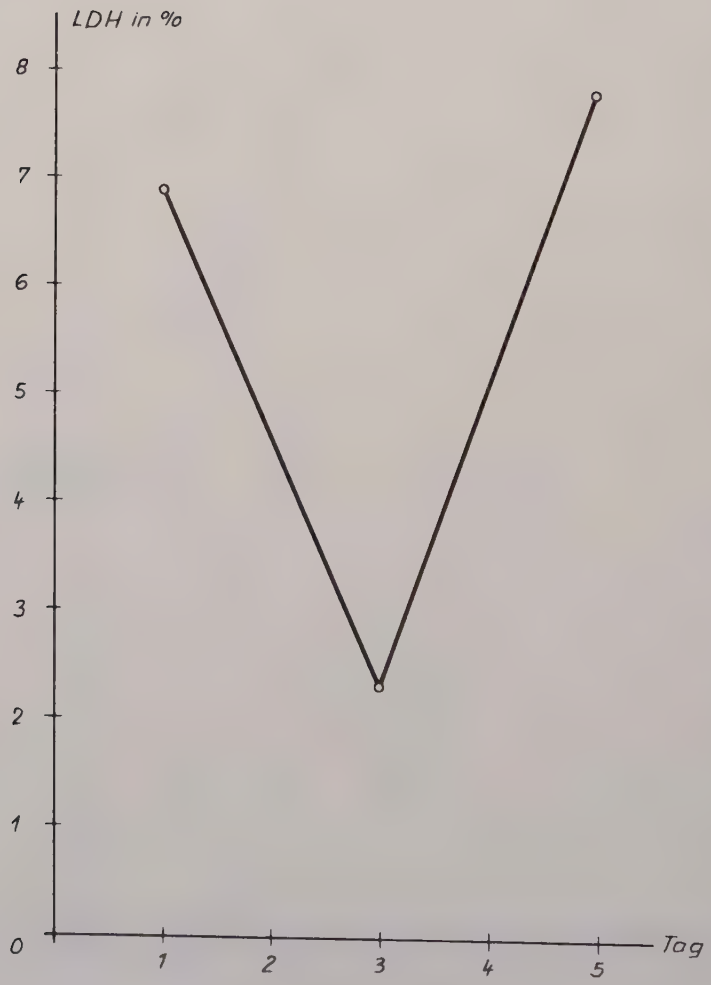
Walker Isoenzym 1 im Homogenat nach Röntgenbestrahlung

Abb. 8



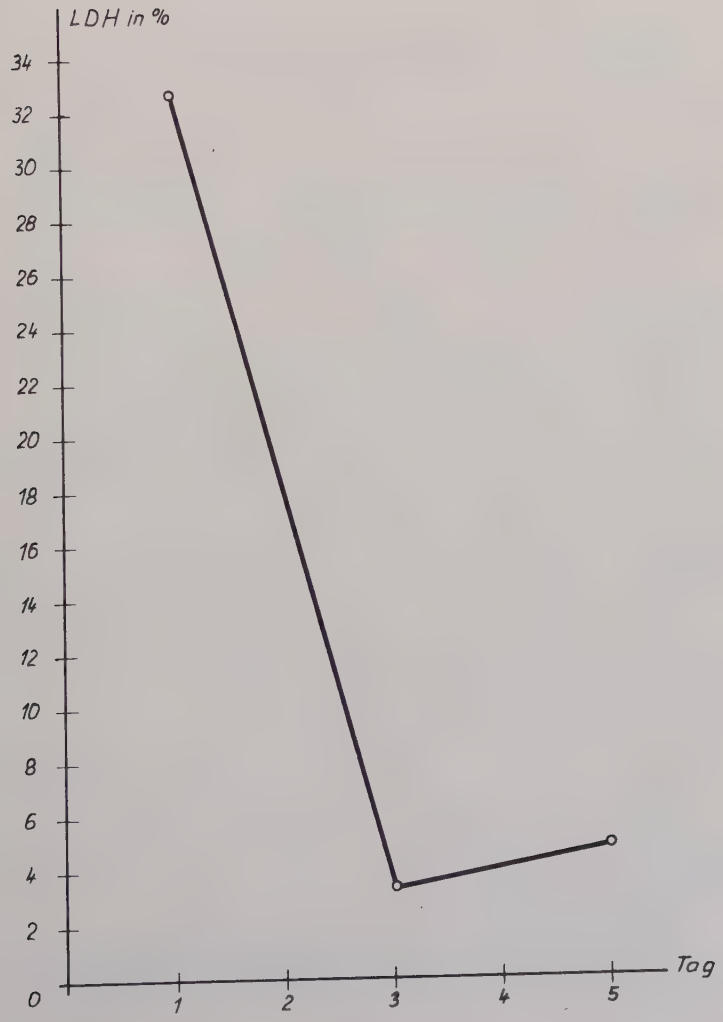
Walker Isoenzym 2 im Serum und Homogenat nach Röntgenbestrahlung

Abb. 9



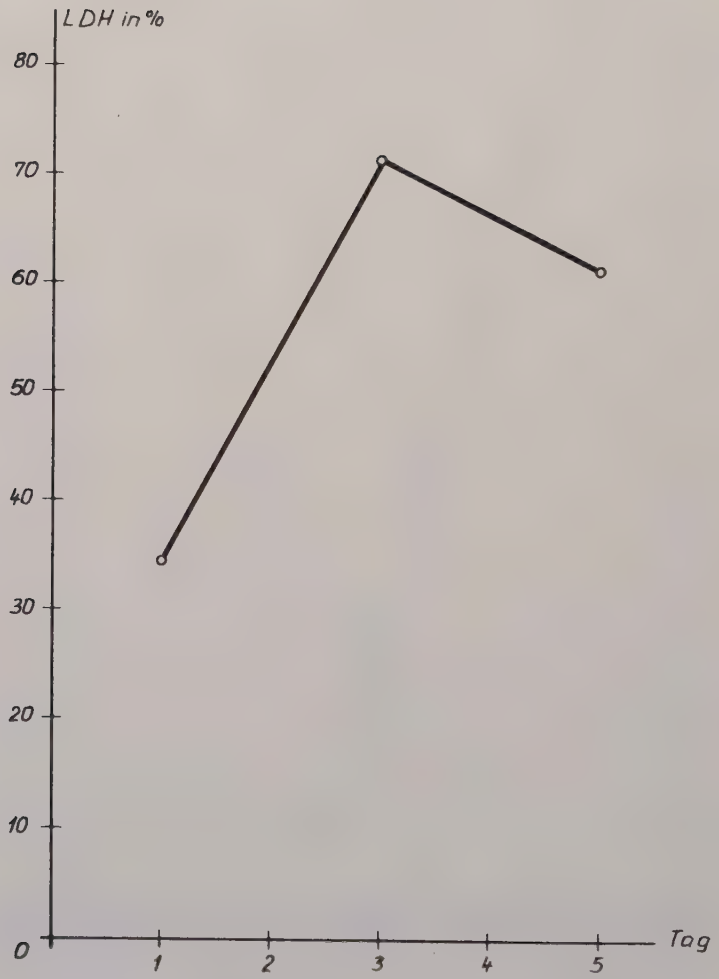
Walker Isoenzym 3 im Homogenat nach Röntgenbestrahlung

Abb. 10



Walker Isoenzym 4 im Homogenat nach Röntgenbestrahlung

Abb. 11



Walker Isoenzym 5 im Homogenat nach Röntgenbestrahlung

Abb. 12

VII. Auswertung und Diskussion

Beim Walker-Carcinom zeigt sich ein signifikanter linearer Anstieg (Abhängigkeit des Anstiegs vom Tumorgewicht und der Zeit des Tumorwachstums) sowohl im Serum als auch im Homogenat (Abb. 1 und 2).

Der Serumanstieg beruht wohl auf dem vermehrten Abfluß der LDH aus dem Tumorgewebe. Dort tritt sie infolge erhöhten Wachstums und des damit verbundenen erhöhten Energiebedarfs auf.

Die LDH erscheint als empfindlichster Indikator der Zellschädigung schon bei leichteren Läsionen der Zellmembran, die mit einer erhöhten Durchlässigkeit einhergehen. Damit ist sie kein Indiz für eine Nekrose des Gewebes.

Trotzdem liegt wohl die mit dem Alter und der Tumorgröße einhergehende lineare Zunahme der Serum-LDH an regressiven Veränderungen im Tumor, wie sie z. B. makroskopisch hauptsächlich bei den schnell wachsenden Tumoren (z. B. Walker-Carcinom) als Nekrosen auftreten. Auch das erhöhte Tumorgewicht an sich ohne Veränderungen ergibt durch die physiologisch erhöhte Absolutzahl absterbender Zellen einen gesteigerten LDH-Abfluß in das Serum. Der initiale LDH-Serumanstieg kann noch Ausläufer der transplantationsbedingten LDH-Zunahme sein, wie sie ohne Angaben von Ursachen schon beschrieben ist. Dem weiteren Anstieg liegen wohl die obengenannten Ursachen zugrunde.

Es scheint wichtig, darauf hinzuweisen, daß es sich bei dem Walker-Carcinom um einen schnell wachsenden Tumor handelt, der von einer Ausgangssuspensionsmenge von 0,5 ml auf eine am 21. Tage 10 Gramm betragende Größe heranwächst. LDH-Anstiege im Serum, die sich signifikant von den bereits darin befindlichen

Organteilen abheben, setzen eine nennenswerte Schädigung von Zellen außerhalb der physiologischen Abnutzungsquote voraus, wie sie bei dem vorliegenden Tumor offenbar gegeben ist.

Die Isoenzyme zeigen untereinander im Serum weder eine signifikante Abnahme noch Zunahme, im Homogenat (Abb. 3 bis 5) findet sich ein Isoenzymanstieg der zweiten Fraktion vom 9. auf den 12. Tag und vom 15. auf den 18. Tag, der vierten Fraktion vom 9. auf den 12. Tag, weiterhin eine Abnahme der Isoenzyme 2 vom 12. auf den 15. Tag und vom 18. auf den 21. Tag und 5 vom 12. auf den 15. Tag.

Man sieht, daß einem Anstieg der Isoenzyme 2 und 4 im Homogenat kein solcher im Serum entspricht. Die Tumorhomogenatkonstellation findet also kein Abbild im Serum. Ob dieses Verhalten auf das gegenüber dem Tumor veränderte Serummilieu als Verdünnungseffekt durch die extrazelluläre Flüssigkeit oder als verzögerte Abgabe aus dem Tumor gerade dieser Isoenzyme aufzufassen ist, muß offen bleiben.

Dem Anstieg des Isoenzyms 2 im Homogenat an zwei Entnahmetagen schließt sich ein Abfall an dem jeweils darauf folgenden Entnahmetag an. Es scheint im Tumor keine kontinuierliche Produktion des Isoenzyms vorzuliegen, aber auch kein rhythmisches Verhalten ist nachweisbar.

Nach Röntgenbestrahlung (Abb. 6) zeigt sich im Serum keine Zunahme oder Abnahme der LDH-Gesamtaktivität oder der LDH-Isoenzyme untereinander, lediglich eine LDH-Abnahme des Isoenzyms 2 vom 3. auf den 5. Tag (Abb. 9). Diesem Bild entspricht im Homogenat (Abb. 7 bis 11) eine Zunahme der Isoenzyme 1, 2, 3 und 4

vom 3. auf den 5. Tag und des Isoenzyms 5 vom 1. auf den 3. Tag. Weiterhin wurde eine Abnahme der Isoenzyme 1, 2, 3 und 4 vom 1. auf den 3. Tag und des Isoenzyms 5 vom 3. auf den 5. Tag festgestellt.

Die Röntgenbestrahlung bewirkt offensichtlich einen Wachstumsstillstand des Tumors, was sich auch makroskopisch bestätigte, mit einer Konstanz in LDH-Produktion im Tumor und Abgabe in das Serum.

Die Bestrahlung scheint aber eine Verschiebung des Isoenzymgefüges im Tumor sowohl zeitlich als auch die einzelnen Fraktionen betreffend hervorzurufen. Dem Homogenatbild entspricht aber wiederum kein Serumbild.

Vom Walker-Carcinom ausgehend scheint eine Frühdiagnostik durch ein tumorspezifisches Serumisoenzymbild unwahrscheinlich. Auch hinsichtlich der Röntgenbestrahlung und unbehandeltem Tumor zeigen sich keine charakteristischen Konstellationen.

VIII. Zusammenfassung

Untersuchungen wurden angestellt, um zu erklären, inwieweit sich eine vorausgesetzte LDH-Gesamtaktivitätserhöhung auf die einzelnen Isoenzyme verteilt, wie der zeitliche Ablauf und die Korrelation des Isoenzymmusters im Tumorhomogenat und Serum ist und wie sich diese Größen nach Röntgenbestrahlung ändern.

Hierbei gelangte das Walker-Carcinom, das bei Sprague-Dawley-Ratten experimentell gezüchtet wurde, zur Anwendung.

Für alle möglichen Abhängigkeiten wurden Signifikanzuntersuchungen angestellt. Dabei wurden zunächst die Mittelwerte aller Aktivitäten in Abhängigkeit von den Tagen bestimmt.

In einigen Fällen stellte sich zwischen den Meßreihen - wie Gesamtaktivität in Serum und Homogenat - eine lineare Abhängigkeit heraus, so daß der Pearson'sche Produktmoment-Korrelationskoeffizient, der ein Maß für eine Regression darstellt, bestimmt wurde.

1. Es zeigte sich ein signifikant linearer Anstieg hinsichtlich der Zeit und des Tumorgewichts der LDH-Gesamtaktivität im Serum als auch im Tumorhomogenat.

2. Nach Röntgenbestrahlung zeigte sich im Serum keine Zunahme oder Abnahme der LDH-Gesamtaktivität oder der LDH-Isoenzyme untereinander, lediglich eine LDH-Abnahme des Isoenzyms 2 vom 3, auf den 5. Tag. Diesem Bild entspricht im Homogenat eine Zunahme der Isoenzyme 1, 2, 3 und 4 vom 3. auf den 5. Tag und des Isoenzyms 5 vom 1. auf den 3. Tag.

Weiterhin wurde eine Abnahme der Isoenzyme 1, 2, 3 und 4 vom 1. auf den 3. Tag und des Isoenzyms 5 vom 3. auf den 5. Tag festgestellt.

3. Die Isoenzyme zeigen untereinander im Serum weder eine signifikante Abnahme noch Zunahme, im Homogenat findet sich ein Isoenzymanstieg der zweiten Fraktion vom 9. auf den 12.Tag und vom 15. auf den 18. Tag, der 4. Fraktion vom 9. auf den 12. Tag, weiterhin eine Abnahme der Isoenzyme 2 vom 12. auf den 15. Tag und vom 18. auf den 21. Tag und 5 vom 12. auf den 15. Tag.

IX. Literaturverzeichnis

1. Amoroso, C.: Über den Einfluß von Röntgen-Ganzkörperbestrahlung auf die Aktivität der Milchsäuredehydrogenase im Blutserum und in Organextrakten bei Ratten. Strahlentherapie 121, 269 (1963)

2. Bonavita, V., Ponte, F. and Amore, G.: Laktate Isoenzymes in the Developing Rat Brain. Nature 196, 576 (1962)

3. Borst: Die Lehre von den Geschwülsten. Allg. Path. der malignen Geschw. (1902)

4. Cahn, R. D., Kaplan, N. O., Levine, L., Zwilling, E.: Nature and Development of Lactic Dehydrogenases. Science 136, 963 (1962)

5. Delbrück, A., Schimassek, H.: Enzymverteilungsmuster in einigen Organen und in experimentellen Tumoren der Ratte und Maus. Bioche. Z. 331, 297 (1959)

6. Domagk: Die Bedeutung körpereigener Abwehrkräfte für die Ansiedlung von Geschwulstzellen. Z. Krebsf. 56, 247 (1949)

7. Druckrey: Experimentelle Beiträge zum Wachstumsproblem bei Geschwülsten und Metastasen. Zeitschr. Krebsf. 56, 407 (1949)

8. Druckrey: Grundproblem der Krebsentstehung. Neue med. Welt 49, 161 (1950)

9. Euler: Über die in wachsenden und in retrograden Rattentumoren wirksamen Faktoren. Z. Krebsf. 57, 501 (1951)

10. Fine, I. H., Kaplan, N. O.: Development and changes of Mamalian LDH. Biochem. Vol 2, No 1, 116 (1963)

11. Fondy, Th. P., Pesce, A., Freedberg, J., Stolzenbach, E., Kaplan, N. O.: The Comperativ Enzymologie of LDH. II. Poperties of the cristalline HM_3 Hybrid from Chicken Muscle and of H_2 M_2 Hybrid and H_4 Enzyme from Chicken Liver. Biochem. Vol. 3, No 4, 522 (1964)

12. Fröhlich, C.: Elektrophoretische Isoenzym-Auftrennung der Laktatdehydrogenase im Agargel. Z. Klin. Chem. 137 (1965)

13. Gerhardt, W.: Lactat dehydrogenases isoenzymes in the diagnosis of human benign and malignant brain tumors. Journal of the national cancer. Institute Vol 38, 343 (1967)

14. Goetze, T. und E.: Gesamtaktivität und Isoenzymmuster der LDH in Organen und Serum mit 800 R röntgenbestrahlter Ratten zur Zeit der Gravidität, im Fötalalter und bei erwachsenen nicht graviden Ratten. Acta biol. et med. germ. 16, 337 (1966)

15. Goldmann, R. D., Kaplan, N. O.: Lactic dehydrogenases in human neoplastic tissues. Cancer res. 24, 389 (1964)

16. Grüssner, G.: Experimentelle Untersuchungen über den Effekt von einseitigen und fraktionellen Röntgenbestrahlungen auf das subkutane Walker-Karzinom der Ratte unter Beatmung mit verschieden hohen Sauerstoffpartialdrucken. Strahlenther. 100, 241 (1956)

17. Hauss, W. H.: Über Änderung von Fermentaktivitäten im Serum als Ausdruck einer unspezifischen Reaktion des Organismus. Klin. Wschr. 65 (1957)

18. Haven, F.L., Bloor, W. R., Randall C.: The nature of the fatty acids of rats frowing Walker-Carcinom 256. Cancer Res. 11, 619 (1951)

19. Helm van der: A simplified method of demonstrating lactic dehydrogenase isoenzymes in serum. Clin. chim. acta 7, 124 (1962)

20. Holzer, H., Schneider, S.: Wasserstoffübertragung von DPNH auf DPN unter Vermittlung von Glutaminsäuredehydrogenase und Milchsäuredehydrogenase. Biochem. Z. 330, 240 (1958)

21. Horn, K. H., Pasternak, G., Graffi, A.: Versuche zur Induktion von Immunität gegen Methylcholanthrentumoren durch Vorbehandlung der Mäuse mit homologen Tumortransplantaten. Acta biol. et med. germ. 9, 309 (1962)

22. Horn, K. H., Pasternak, G., Graffi, A.: Untersuchungen über die Persistenz tumorspezifischer Antigene bei Methylcholanthren-induzierten Sarkomen der Maus nach verschiedenen Transplantationspassagen in isologen Wirten und F_1-Hybriden. Acta biol. et med. germ. 11, 298 (1963)

23. Hsieh, K. M., Suntzeff v.: Comperative study of serum lactic dehydrogenases activity in mice with transplantated and induced tumors. Cancer Res. 16, 237 (1956)

24. Hsieh, K. M.: Serum Lactic Dehydrogenase Aktivity as Indication of Neoplastic Growth and Regression. Proc. Soc. exp. Biol. 89, 627 (1955)

25. Johnson, H. L.: Lactic dehydrogenases isozymes in rat tissues tumors and precancerous liver. Proceed. of the Society for Experimental Biology and Medizine 120, 557 (1965)

26. Kaplan, N. O.: Molekular Heterogenity and Evolution of Enzymes. Science 131, 392 (1960)

27. Kaplan, N. O.: The denaturation of lactic dehydrogenase II. J. biol. chem. 240, 1072 (1965)

28. Kaplan, N. O., White, S.: Immunological Characteristics of Dehydrogenases. Ann. of the N. Y. Acad. of Science 103, 835 (1963)

29. Karl, W. F.: Thermal stability of lactic dehydrogenases from human tissues. American journal of clin. pathol. 47, 171 (1967)

30. Karrer, K.: Ergebnisse der intravenösen Implantation von Impftumoren. Wiener klin. Wschr. 69, 205 (1957)

31. Karrer, K.: Experimentelle Studien zum Problem der Tumormetastasierung. Klin. med. Wien 20, 313 (1965)

32. Köhne, E.: Nachweis intravenös injizierter Tumorzellen des Walker-Carcino-sarkoms im Blut und in den Organen von Ratten. Inaug. Diss. München (1962)

33. Lidgas, E.: Über das Problem der hämatogenen Metastasierung beim Karzinom. Arch. Geschwulstf. 4, 339 (1952)

34. Lührs, W.: Über das Vorkommen von LDH im Serum krebskranker Patienten. Klin. Wschr. 149 (1956)

35. Markert, C. L., Appella, E.: Immunochemical Properties of Lactate Dehydrogenase ISoenzymes. Ann. of the N. Y. Acad. of Sciences 94, 915 (1961)

36. Markert, C. L.: Lactate dehydrogenase isoenzymes. Dissociation and Rekombination of Subunits. Science 140, 1329 (1963)

37. Markert, C. L., Apella, E.: Immunochemical Properties of Lactate Dehydrogenase Isozymes. Ann. of N. Y. Acad. of Sciences 103, 915 (1963)

38. Nemeth, L., Kellner, B.: In Form von Ascites transplantierbare leukämische Lymphadenose bei Mäusen. Die Naturwissenschaften 47, 544 (1960)

39. Oswald, H.: Über den Einfluß von Röntgenganzkörperbestrahlung auf die Aktivität der Milchsäuredehydrogenase sowie Glutaminsäure-Oxalatessigsäure und Glutaminsäure-Transaminase im Blutserum bei Ratten. Strahlenth. 109, 331 (1959)

40. Parchwitz, H. K.: Wirkung einseitiger Röntgenbestrahlung auf den Funktionsformwechsel des Nuklearapparates der Walker-Karzinomzelle. Strahlenth. 104, 6 (1957)

41. Pasternak, G.: Die unterschiedliche Reaktionsfähigkeit zweier Mäusezuchtstämme gegen spezifische Antigene isolog transplantabler Carcinogentumoren. Acta biol. et med. germ. 10, 572 (1963)

42. Pfleiderer, G., Jeckel, D.: Individuelle Milchsäuredehydrogenasen bei verschiedenen Säugetieren. Biochem. Z. 329, 370 (1957)

43. Pfleiderer, G., Jeckel, D., Wieland, Th.: Zum Wirkungsmechanismus der LDH, die schützende Wirkung von Coenzym-Addukten gegenüber denaturierenden Agentien. Biochem. Z. 329, 104 (1957)

44. Pfleiderer, G., Wachsmuth, E. D.: Alters- und funktionsabhängige Differenzierung der Lactatdehydrogenase menschlicher Organe. Biochem. Z. 334, 185 (1961)

45. Pfleiderer, G., Jeckel, D., Wieland, Th.: Über den Wirkungsmechanismus der Milchsäuredehydrogenase II. Biochem. Z. 330, 269 (1958)

46. Poznanska-Linde, H.: Lactate dehydrogenase enzymes in malignant tissues. Nature 209, 727 (1966)

47. Rajewski, K., Avrameas, S., Grabar, P., Pfleiderer, G., Wachsmuth, E. D.: Immunologische Spezifität von LDH-Isoenzymen dreier Säugetierorganismen. Biochemica et Biophysica, Acta 92, 248 (1964)

48. Richterich, R., Burger, A.: Lactic Dehydrogenase Isoenzymes in Human Cancer Cells and Malignant Effusions. Enzymolog. Biolog. et Clin. 3, 65 (1963)

49. Richterich, R., Locher, J.: Die Differentialdiagnose maligner und benigner Ergüsse durch Bestimmung der Lactatdehydrogenase Isoenzyme. Med. Wschr. 92, 919 (1962)

50. Richterich, R., Zuppinger, K.: Diagnostic significance of hetrogenious lactic dehydrogenases in malignant effusions. Nature 191, 507 (1961)

51. Richterich, R., Colombo, J. P.: Study of lactic dehydrogenase isozyme pattern of human tissues by adsorptions-elution on sephadex-DEAE. Clin. chim. act. 8, 178 (1963)

52. Richterich, R., Locker, J., Zuppinger, K.: Die Differentialdiagnose maligner und benigner Ergüsse durch Bestimmung der Lactatdehydrogenase Isoenzyme. Schweitz. med. Wschr. 92, 919 (1962)

53. Schmähl, D.: Krebsmetastasen: Ihre Entstehung und Prophylaxe. Med. Welt 40, 1847 (1959)

54. Schmähl, D.: Experimentelle Untersuchungen an Ratten über die Metastasierung von Tumoren. Z. Krebsf. 62, 456 (1958)

55. Schmähl, D.: Experimentelle Untersuchungen an Ratten zum Mechanismus der Metastasierung. Z. Krebsf.65, 289 (1963)

56. Schmähl, D.: Die Metastasierung der Tumoren und ihre Beeinflussung. Med. Welt I 544 (1964)

57. Schmidt, F.: Erfahrungen mit einer Tumorbank zur Konservierung von Transplantationstumoren. Strahlenth. 177, 565 (1962)

58. Sherwin: Altered LDH isozymes in brain tumors. Arch. of neurol. Vol 18, 311 (1968)

59. Soetens, A.: Presence of additional LDH isozymes in two cases of brain tumor. Enzym. in clin. chem. 130 (1965)

60. Stammbaugh, R.: The enzymic and molecular nature of the lactic dehydrogenase subbands and X_4-isozyme. J. of biol. chem., Vol 242, 4053 (1967)

61. Stammbaugh, R.: Effects of tissues extracts and temperature on lactate dehydrogenase isozymes. Biochem. et biophys. acta 122, 541 (1966)

62. Starkweather, W. H., Schoch, H. K.: Some Observations on the Lactate Dehydrogenase of human neoplastic tissue. Biochem. et biophys. acta 62, 440 (1962)

63. Vesell, E. S.: Lactate dehydrogenase isozymes: Substrate inhibition in various human tissues. Science Vol 150, 1590 (1965)

64. Wachsmuth, E. D., Pfleiderer, G.: Biochem. Untersuchungen an kristallinen Isoenzymen der LDH aus menschlichen Organen. Biochem. Z. 336, 545 (1963)

65. Wachsmuth, E. D., Pfleiderer G., Wieland, Th.: Aminosäurezusammensetzung von Isoenzymen der LDH aus menschlichen und tierischen Organen. Biochem. Z. 340, 80 (1964)

66. Warburg, O., Kubowitz, F.: Stoffwechsel wachsender Zellen. Biochem. Z. 189, 242 (1927)

67. Warburg, O.: The metabolism of tumors. Constable, London (1930)

68. Wieland, Th., Pfleiderer, G.: Nachweis der Heterogenität von LDH's verschiedenen Ursprungs durch Trägerelektrophorese. Biochem. Z. 329, 112 (1957)

69. Wieland, Th., Pfleiderer, G., Haupt, J., Wörner, W.: Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen. Biochem. Z. 332, 1 (1959)

70. Wieland, Th., Pfleiderer, G., Ortlanderl, F.: Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen. III. Vergleiche der LDH aus verschiedenen Rattenorganen. Biochem. Z. 331, 103 (1959)

71. Wieland, Th., Pfleiderer, G.: Chemical Differences between multiple Forms of Lactic Acid Dehydrogenases. Ann. of the N. Y. Acad. of Sciences 94, 691 (1961)

72. Wieland, Th., Pfleiderer, G.: Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenase V. Z. Naturf. 15 b, 434 (1960)

73. Wieland, Th., Georgopoulos, D., Kampe H., Wachsmuth, E. D.: Analyt. Beweis der Hybridnatur von Isoenzymen der LDH, Biochem. Z. 340, 483 (1964)

74. Wieland, Th., Duesberg, P., Determann, H.: Zum Molekulargewicht der Lactat-dehydrogenasen. Studien des Verhaltens bei der Gelfiltration. Biochem. Z. 337, 303 (1963)

75. Wieme, R. J.: The fifth (elektrophoretically slowest) serum lactic dehydrogenase as an index of liver injury. Ann. N. Y. Acad. of Sciences 94, 898 (1961)

76. Wroblewski, F.: Lactic dehydrogenase isozymes and their distribution in normal tissues and plasma and in desease states. Ann. N. Y. Acad. of Sciences 94, 912 (1961)

77. Wüst, H.: Serumisoenzyme der LDH bei Kranken mit malignen Tumoren. Verhandlung der deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 71, 949 (1965)

78. Wüst, H.: Vergleichende Untersuchungen von LDH-Isoenzymbestimmungsmethoden. Das ärztliche Laboratorium, J. 12, 97 (1966)

79. Yamamoto, N.: The activities of lactic dehydrogenase in serum and effusion of malignant tumors and some other diseases. Iryo. official publication of the national hospitals and sanatories of Japan. Vol 19, 395 (1965)

80. Zondag, H. A.: Activity of LDH in patients with malignant tumors of testis and ovary. Enzymes in clin. chem. 120, (1965)

81. Zuppinger, K., Richterich, R.: Die diagnostische Bedeutung der Hetrogenität der Serumlaktatdehydrogenasen. Schweitz. med. Wschr. 92, 169 (1965)

Lebenslauf

Am 11. Januar 1941 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Dr. med. dent. Paul Thiele und seiner Ehefrau Paula geb. Dresen in Bochum geboren.

Vom 1. April 1947 bis zum 31. März 1949 besuchte ich das 1. und 2. Schuljahr der 8-klassigen Volksschule in Castrop-Rauxel. Durch den Umzug meiner Eltern nach Gelsenkirchen besuchte ich hier ab 1. April 1949 das 3. und 4. Schuljahr der 8-klassigen Volksschule, im 5. Schuljahr die Volksschule in Herbede.

Vom 1. April 1952 bis zum 31. Dezember 1959 war ich Schüler des staatlich anerkannten Internats "Canisianum" in Lüdinghausen. Vom 9. Januar 1960 bis zum 3. April 1962 besuchte ich - nach Verlassen des Internats - die private Tages- und Abendschule Friessen Studienrat a. D. in Essen. Dort war ich Schüler der Unter- und Oberprima.

Am 3. April 1962 meldete ich mich als Externer zur Nichtschülerreifeprüfung in Münster beim Schulkollegium des Regierungspräsidenten. Diese Prüfung habe ich nicht bestanden.

Von Ostern 1962 bis zum 28. Februar 1963 besuchte ich die Oberprima des Gymnasiums Philippinum in Weilburg (Hessen). Nach erfolgreicher Ablegung der Reifeprüfung begann ich im Sommersemester 1963 das Studium der Philologie an der Philipps-Universität in Marburg.

Zu Beginn des Wintersemesters 1964/65 habe ich mich zur Naturwissenschaftlichen Fakultät umschreiben lassen und wurde zum Wintersemester 1965/66 unter Anrechnung des Sommersemesters 1965 zur Zahnheilkunde zugelassen.

Am 26. März 1966 bestand ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung der Zahnmediziner (neue Prüfungsordnung), am 10. Oktober die Zahnärztliche Vorprüfung.

Am 11. Juni 1970 habe ich die Zahnärztliche Prüfung in Marburg bestanden und bin seit dem 1. Dezember 1970 als Zahnarzt in Wanne-Eickel tätig.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren, Dozenten und Doktoren:

Bommer, Dimroth, Gedik, Hennis, Hering, Heuser, Havemann, Janke, Kampke, Karlson, Korb, Koransky, Kreutz, Mann, Niemeyer, Pantke, Petry, Pfütz, Rodeck, Rohen, Rosemann, Salfeld, Seidel, Siegert, Staib, Streicher, Strohmeyer, Schiff, Schnell, Schmid, Schmitz-Moormann, Voss und Walcher.

Herrn Professor Dr. med. Heß danke ich für die freundliche Überlassung des Themas sowie Herrn Oberarzt Dr. med. Buchelt für seine Unterstützung bei der Entstehung der Arbeit.